

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA

BRUNO BLASZCZYK NEVES

**DOENÇA DE ALZHEIMER: ESTUDO POR DOCAGEM MOLECULAR ENTRE O
CLORPIRIFÓS E A PROTEÍNA TAU**

CURITIBA - PARANÁ

2021

BRUNO BLASZCZYK NEVES

**DOENÇA DE ALZHEIMER: ESTUDO POR DOCAJEM MOLECULAR ENTRE O
CLORPIRIFÓS E A PROTEINA TAU**

**Alzheimer's Disease: A Molecular Docking study between Chlorpyrifos and Tau
Protein**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Química da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Jonas Golart da Silva

CURITIBA - PARANÁ

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

BRUNO BLASZCZYK NEVES

**DOENÇA DE ALZHEIMER: ESTUDO POR DOCAGEM MOLECULAR ENTRE O
CLORPIRIFÓS E A PROTEÍNA TAU**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Química da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 06 de dezembro de 2021.

Prof. Dr. Jonas Golart da Silva
Doutor em Farmacologia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Curitiba

Prof. Dr. Marcos Brown Gonçalves
Doutor em Física
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Curitiba

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto
Doutor em Ciências - Bioquímica
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Curitiba

CURITIBA

2021

Dedico tudo à minha irmã.

AGRADECIMENTOS

A jornada universitária dentro da química é repleta de momentos de epifania e uma quantidade generosa de trabalho. Dentro desses agradecimentos, seria impossível mencionar cada pessoa que me ajudou, desde projetos, risadas, suporte e amizade.

Gostaria de agradecer a todos os amigos que fiz, dos que entraram comigo e desbravaram o começo do desconhecido, aos que tenho um contato ativo até hoje. Aos professores que me ensinaram muito e no qual vou me espelhar profissionalmente e academicamente pelo resto da minha vida. Uma menção necessária aos representantes dos laboratórios que participei, foram vários.

Aos suportes fora da universidade, agradeço a minha família, aos amigos, irmãos que a vida me deu, do Check-it-out e da Quinta dos Brothers. Sempre me apoiando e escutando meus relatos científicos e piadas elaboradas, e (demonstrando que estão) entendendo. Um agradecimento especial a minha namorada por todo o suporte com o TCC e as noites em claro para finalizar. E dedico esse projeto à minha irmã e minha melhor amiga que sempre esteve ao meu lado toda vida (literalmente), conquistamos mais esta etapa juntos.

Agradeço imensamente ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Golart da Silva por ter me apresentado a Química Farmacêutica e Medicinal, essa área a qual me apaixonei e me mesmeriza a cada leitura. Graças ao seu apoio e do grupo do laboratório, viagens, copos divididos, histórias, risadas e orientação (e claro todas as conversas para meu por meus pés no chão e clarear meus pensamentos), que eu consegui finalizar esta grande etapa da minha vida.

Enfim, parece que tudo se reflete nesse momento, mas essa é só uma pequena etapa do que está por vir!

The only criterion of a model is its usefulness, not
its “truth”.

O único critério de um modelo é sua utilidade, não
sua “verdade”.

(Michael J. S. Dewar, *J. Am. Chem. Soc.* 1984,
106, 3, 669–682).

RESUMO

Segundo dados da OMS e ALZ.ORG, mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo têm a doença de Alzheimer (DA), uma disfunção da memória e outros domínios cognitivos que levam à morte dentro de 3 a 9 anos após o diagnóstico. A DA é a forma mais comum de demência, representada por 70% dos casos em autópsias e séries clínicas. Sendo assim, a sétima maior causa de mortes no mundo. O principal fator de risco da doença de Alzheimer é a idade. São diagnosticados anualmente 1275 novos casos a cada 100.000 pessoas acima de 65 anos no mundo; e as chances de receber o diagnóstico da doença após os 85 anos de idade excedem uma em cada três. No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Alzheimer (Abraz), são mais de 1,2 milhões de casos e o número dobrará até 2030. Danos moleculares foram detectados na doença de Alzheimer, que gera um acúmulo de proteínas dobradas no cérebro envelhecido resultando em danos oxidativos e inflamatórios, que por sua vez levam à falha energética e disfunção sináptica. Dentro desta linha de pensamento, destaca-se a Hipótese de Beta-Amiloide (β A) e Hipótese do Emaranhamento Tau, também denominado Emaranhados Neurofibrilares – ENF. O desenvolvimento DA é drasticamente influenciado pela dieta e estudos revelam a ligação entre pesticidas e problemas neurológicos. Porém, correlacionando pesticidas e ENF foram encontradas poucas informações, um dos responsáveis pela DA e um dos principais marcadores para comprovar a doença post-mortem através de necrópsia. O clorpirifós é um organofosforado (OFs) utilizado principalmente como inseticida. Compostos OFs possuem uma alta estabilidade das ligações entre os átomos de oxigênio e fósforo, e são comumente associados pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), o que gera a sua alta toxicidade. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in silico*, os efeitos toxicológicos da molécula Clorpirifós frente a interação da proteína Tau e o sítio de ligação da sua macromolécula e a formação de ENF. Buscando assim, compreender a possível relação com o desenvolvimento da DA. Utilizou-se o método *in silico* de docagem molecular disponibilizado pelo LNCC DockThor. Através do uso do programa e aplicando a estratégia de docagem por acoplamento cego, localizou-se dois sítios de ligação na proteína tau. Ambos com afinidade para o Clorpirifós (CPF), e um com o seu metabólito, Clorpirifós-Oxon (CPF-O). As melhores poses obtiveram resultados de energia total e distância de ligação de: CPF-O(-)20,271 kcal·mol⁻¹ e duas ligações de hidrogênio uma de 1,80 Å e outra de 2,78 Å; CPF(-)17,472 kcal·mol⁻¹ e uma ligação de hidrogênio de 2,56 Å.

Palavras-chave: Acoplamento Molecular; Proteína Tau; Clorpirifós; Doença de Alzheimer; DockThor.

ABSTRACT

According to data from the WHO and ALZ.ORG, more than 50 million people worldwide have Alzheimer's disease (AD), a dysfunction of memory and other cognitive domains that lead to death within 3 to 9 years after diagnosis. AD is the most common form of dementia, represented by 70% of cases in autopsies and clinical series. As such, the seventh largest cause of death in the world. The main risk factor for Alzheimer's disease is age. 1275 new cases are diagnosed annually for every 100,000 people over 65 in the world; and the chances of receiving a diagnosis of the disease after the age of 85 years exceeds one in three. In Brazil, according to the Brazilian Alzheimer's Association (Abraz), there are more than 1.2 million cases, and the number will double by 2030. Molecular damage was detected in Alzheimer's disease, which generates an accumulation of folded proteins in the aging brain, resulting in oxidative and inflammatory damage, which in turn lead to energy failure and synaptic dysfunction. Within this line of thought, the Beta-Amyloid Hypothesis (β A) and Tau Entanglement Hypothesis stand out, also called Neurofibrillary tangles – ENF. AD development is drastically influenced by diet and studies reveal the link between pesticides and neurological problems. However, correlating pesticides and ENF, little information was found, one of those responsible for AD and one of the main markers to prove post-mortem disease through necropsy. Chlorpyrifos is an organophosphate (OP) used primarily as an insecticide. Compounds OFs have a high stability of bonds between oxygen and phosphorus atoms and are commonly associated by the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), which generates their high toxicity. The aim of this study was to evaluate, in syphilic, the toxicological effects of the Chlorpyrifos molecule against the interaction of tau protein and the binding site of its macromolecule and the formation of NSF. Thus, seeking to understand the possible relationship with the development of AD. The in-sy method of molecular docking provided by LNCC DockThor was used. By using the program and applying the blind coupling docking strategy, two binding sites were found in the tau protein. Both with affinity for Chlorpyrifos (CPF), and one with its metabolite, Chlorpyrifos-Oxon (CPF-O). The best poses obtained results of total energy and binding distance of: CPF-O (-)20,271 kcal·mol⁻¹ and two hydrogen bonds one of 1.80 Å and the other of 2.78 Å; CPF (-)17,472 kcal·mol⁻¹ and a hydrogen bond of 2.56 Å.

Keywords: Molecular Docking; Tau Protein; Chlorpyrifos; Alzheimer's Disease; DockThor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação de um neurônio apresentando suas partes principais....	14
Figura 2 – Representação do Microtúbulo com a Proteína Tau. O esquema descreve a hiperfosforilação da Tau que causa a desestabilização do microtúbulo.....	16
Figura 3 – Molécula de Clorpirifós (lado esquerdo) e molécula de seu metabólito Clorpirifós-Oxon (lado direito).....	18
Figura 4 – Visualização gráfica da proteína 6CVN. As tubulinas do microtúbulo (em roxo, laranja e verde) com a proteína tau acoplada na região exterior (em rosa).....	24
Figura 5 – Ampliação de uma região da 6CVN, apresentando o ligante em vermelho localizado nas estruturas da tubulina (tubulina em roxo, laranja e verde) e a proteína tau (filamento em rosa acima da tubulina).....	25
Figura 6 – Proteína Tau Livre (2MZ7).....	26
Figura 7 – Molécula de CPF (esquerda) e CPF-O (direito) após a otimização conformacional energética.....	26
Figura 8 – Preparação da Tau-L no DOCKTHOR. A caixa envolta da molécula indica a região no qual o programa irá procurar por sítios de acoplamento.....	27
Figura 9 – Sítio A de acoplamento. Em verde a molécula de CPF e em amarelo a molécula CPF-O.....	28
Figura 10 – Visualização da molécula de CPF no Sítio B simultaneamente com Sítio A atrás.....	28
Figura 11 – As melhores quatro poses do ranque visualizadas simultaneamente no Sítio A, sendo a verde a pose 9 que ocupa a primeira posição.....	30
Figura 12 – A melhor pose (Pose 9) acoplada no Sítio A.....	30
Figura 13 – Visualização 2D (esquerda) e 3D (direita) das interações de hidrogênio entre a molécula CPF-O e a Lisina 267.....	31
Figura 14 – As melhores quatro poses do ranque visualizadas simultaneamente no Sítio A, sendo a amarelo a pose 11 que ocupa a primeira posição (poses 11, 14, 21, 5).....	32
Figura 15 – A melhor pose (Pose 11) acoplada no Sítio A.....	32
Figura 16 – Sítio A. Visualização 2D (esquerda) e 3D (direita) das interações de hidrogênio (distância de 2,56 Å) entre a molécula CPF e o resíduo de Lisina 267...	33
Figura 17 – Sítio B. Visualização 2D (esquerda) e 3D (direita) das interações de hidrogênio (distância da ASN de 3,10 Å; da GLN de 3,09 Å; e da HIS de 2,90 Å) entre a molécula CPF e os resíduos de Asparagina, Glutamina e Histidina.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ranque em ordem de energia total de interação da molécula de CPF-O com o Sítio A da proteína Tau-L.....	29
Tabela 2 - Ranque em ordem de energia total de interação da molécula de CPF com o Sítio A e B da proteína Tau-L.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
APOE4	Ds
CPF	Clorpirifós
CPF-O	Clorpirifós-Oxon
DA	Doença de Alzheimer
DAC	Docagem por Acoplamento Cego
OF	Organofosforado
RMSD	Root Mean Square Deviation – Desvio de Raiz Quadrada Média
Tau-AM	Proteína Tau Acoplada ao Microtúbulo
Tau-L	Proteína Tau Livre

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Neurônio	13
1.2	Microtúbulos	14
1.3	Proteína Tau	15
1.4	Hipótese Tau	15
1.5	Pesticidas Organofosforados	16
1.6	Docagem Molecular	18
1.6.1	Programa DockThor	19
1.6.2	Cálculo de energia total do DockThor	20
1.6.3	Cálculo de RMSD do DockThor	21
2	DESENVOLVIMENTO E METODOLOGIA	23
2.1	Docagem por Acoplamento Cego	23
2.1.1	Receptores	24
2.1.2	Preparo dos Ligante	26
2.2	Docagem Proteína Tau-Livre com CPF e CPF-O	27
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1	Cálculo da Tau-Livre com CPF-O	29
3.2	Cálculo da Tau-Livre com CPF	31
4	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

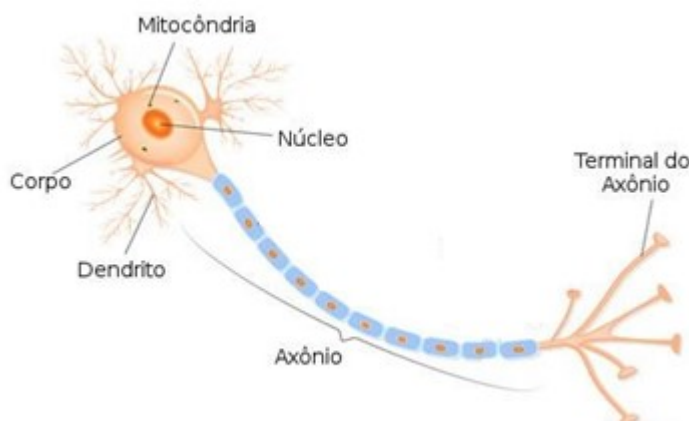
1 INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa crônica que tem um impacto lento quando assintomática, mas que gradualmente causa problemas mentais como perda de memória e dificuldade de aprendizado conhecido como demência. Assim, o sinal clínico mais comum é a incapacidade de recordar os eventos recentes nos estágios iniciais da DA, ou recordar ações rotineiras nos estágios avançados (BURNS e ILIFFE, 2009). Cerca de 70% dos pacientes com DA sofrem da doença por herança genética, sendo o alelo $\epsilon 4$, da Apolipoproteína E (APOE4), o fator de risco genético mais significativo, podendo aumentar o risco de DA em até 10 vezes em indivíduos homozigotos (FARRER e colab., 2015; WARD e colab., 2012) e constituinte das placas beta-amilóides (βA) (NAMBA et al., 1991; WISNIEWSKI; FRANGIONE, 1992). Independente dos fatores genéticos e externos, há dois principais causadores da doença: as placas βA , originadas da proteína precursora de amiloide, responsável pela elevação da quantidade do produto βA_{42} que por si, se acumulam em placas, e os emaranhados neurofibrilares, frutos da hiperfosforilação da proteína tau. As causas são chamadas, respectivamente, de Hipótese Beta Amiloide e Hipótese de Tau (BALLARD e colab., 2011).

1.1 Neurônio

Os neurônios são parte das células que compõem o sistema nervoso, capazes de responder a estímulos elétricos que se propagam e são transmitidos a outros neurônios e possibilitam ao organismo a execução de respostas adequadas para sua manutenção, compostos basicamente pelo corpo celular, axônio e dendritos. A recepção e processamento das informações permite a transmissão e comunicação com outras células por meio da liberação de neurotransmissores, tanto para continuar o processo de transmissão entre os próprios neurônios, quanto para direcionar algum sinal para outras células, como as constituintes do sistema muscular ou endócrino (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017).

Figura 1 – Representação de um neurônio apresentando suas partes principais.



Fonte: Adaptado ao português do Queensland Brain Institute (2019).

No corpo celular é onde encontra-se o núcleo e organelas necessárias para a manutenção da célula. O axônio é um prolongamento único com a função de conduzir os impulsos que transmitem informações a outros corpos celulares e os dendritos são prolongamentos ramificados e em grande quantidade, que permitem a recepção de estímulos. O espaço de proximidade entre neurônios é onde ocorre as sinapses - a troca de informações propriamente dita, através de estímulos elétricos e químicos, mediados por neurotransmissores (ALBERTS, 2017).

1.2 Microtúbulos

Os microtúbulos são responsáveis em promover estabilidade estrutural aos neurônios, além de possibilitar o transporte intracelular de neurotransmissores, mitocôndrias e outras substâncias envolvidas no processo sináptico (DENT e BAAS, 2011; LASSER e colab., 2018). São compostos por pequenos tubos formados por treze filamentos compostos por uma cadeia de tubulina (proteínas globulares que compõem os microtúbulos). Funcionam como estradas que estabilizam toda a extensão de um corpo neuronal até a extremidade de seu axônio, permitindo uma comunicação em rede para o transporte de moléculas essenciais de seu local de síntese ao local de ação (WANG e LIU, 2008).

1.3 Proteína Tau

A proteína Tau é uma fita proteica composta por um domínio longo N-terminal, um domínio repetitivo em cadeia e um domínio curto C-terminal (GOEDERT e colab., 2017). No cérebro humano, as proteínas tau codificam seis isoformas que variam em tamanho (352-441 aminoácidos). Estas isoformas se diferem pela presença de três ou quatro repetições no C-terminal e a presença ou ausência de uma ou duas inserções, de 29 ou 58 aminoácidos, na região N-terminal (HIMMLER e colab., 1989).

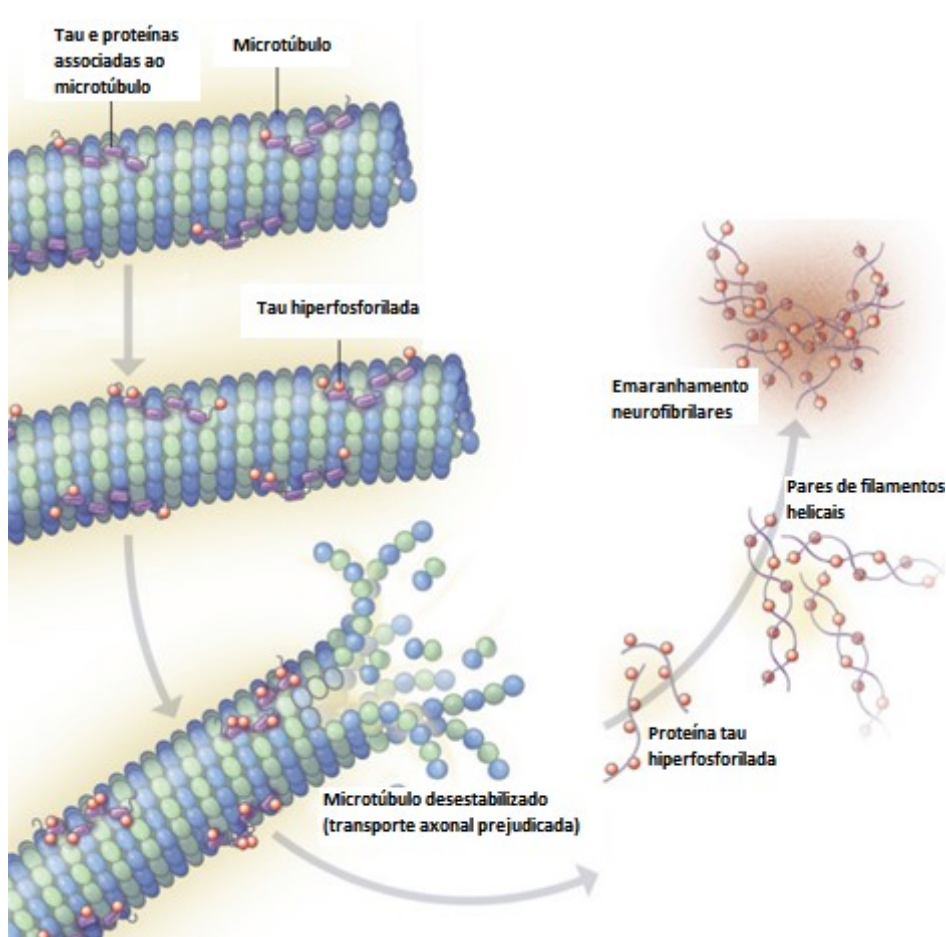
Em sua porção N-terminal pode ocorrer fosforilação - adição de um grupo fosfato (PO_4) à sua configuração - e o domínio repetitivo estabiliza os microtúbulos à medida que se agrupam, unindo as subunidades de tubulina (CHONG e colab., 2018). É uma das proteínas associadas aos microtúbulos, possui função estrutural e promove a estabilidade dos agrupamentos tubulina, parte da estrutura dos axônios dos neurônios (KUTTER e colab., 2016). É normalmente encontrada em maior parte na região do axônio, podendo ser encontrada em toda a célula quando associada a doenças neurodegenerativas, as taupatias (LEE e colab., 2001), justamente pela sua agregação patológica nas células, como o que ocorre na DA e Doença de Parkinson. A tau hiperfosforilada pode afetar a função sináptica de várias formas, como a interrupção do transporte de mitocôndrias via axônios, demonstrando a desregulação sináptica em cérebros afetados pela DA, porém independente da patologia beta-amiloide (PING e colab., 2018).

1.4 Hipótese Tau

Com a degeneração cerebral é possível que ocorra o acúmulo de proteínas, lipídeos e outras substâncias que culminam em inflamações e disfunção nas funções celulares cerebrais (IHARA e colab., 2015; KAMETANI e HASEGAWA, 2018). A proteína tau é capaz de se acumular no interior dos corpos celulares e com o tempo, a agregação e hiperfosforilação geram oligômeros da proteína, insolúvel, que carece de afinidade pelos microtúbulos e associa-se a estruturas de filamentos helicoidais emparelhados (Figura 2), se concentram no interior das células e espalham-se para o espaço extracelular infiltrando-se em neurônios vizinhos, além de causarem a perda de estabilidade e função da proteína, o que leva à desintegração dos microtúbulos e

formação de emaranhados neurofibrilares (RIEDEL e colab., 2020; WISCHIK e colab., 2014). Além disso, a presença de β A é causadora de estresse aos neurônios levando-os a hiperfosforilar a proteína tau da ligação do microtúbulo (ROBBINS e COTRAN, 2010). Com isso, ocorre a interrupção de processos sinápticos e morte celular. Cabe ressaltar que a observação de emaranhados neurofibrilares e acúmulo de placas senis derivadas da agregação de proteínas β -amilóide, representam as características patológicas observadas nos exames de pacientes acometidos pela DA (LEE e colab., 2001).

Figura 2 – Representação do Microtúbulo com a Proteína Tau. O esquema descreve a hiperfosforilação da Tau que causa a desestabilização do microtúbulo.



Fonte: Adaptado de Querfurth e Laferla (2010).

1.5 Pesticidas Organofosforados

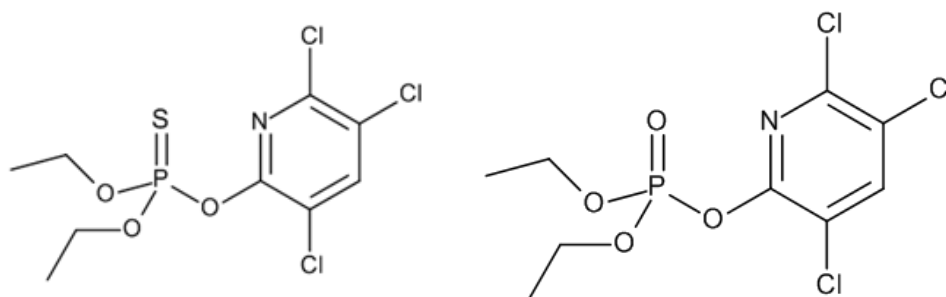
Os defensivos agrícolas são compostos químicos amplamente utilizados na agricultura e responsáveis por inúmeros casos de intoxicação em humanos e

relacionados a processos neurodegenerativos (KILLIN e colab., 2016; YEGAMBARAM e colab., 2015), sendo que os principais casos de intoxicações ocorrem devido à exposição a classe de defensores agrícolas organofosforados. Esta classe de pesticidas tornou-se um dos grupos mais amplamente utilizados de produtos químicos para controle de pragas. Em 1989, quase 40% do mercado global de inseticidas de US\$6,2 bilhões eram compostos por organofosforados (OFs). (MOSTAFALOU e ABDOLLAHI, 2018; SÁNCHEZ-SANTED e colab., 2015).

A exposição a estes compostos ocorre durante a sua aplicação, particularmente aos trabalhadores rurais, população com grande incidência de doenças como câncer, Doença de Parkinson, disfunções reprodutivas e DA (VOORHEES e colab., 2019) ou ainda pela ingestão de alimentos ou água contaminados. Embora a alta concentração de pesticidas seja considerado citotóxico e neurotóxico, no caso da DA o que é relevante para a correlação com o desenvolvimento da doença é provavelmente a exposição crônica, de baixa dosagem no âmbito de exposição ambiental e ocupacional, por isso tão expressivo em trabalhadores que ficam expostos por longos períodos (TANG, 2020).

O clorpirifós (CPF) é um OF amplamente utilizado na produção agrícola do Brasil. Pode ser encontrado na forma sólida como um cristal de cor branca a incolor. É um composto lipofílico que, quando metabolizado, se transforma em um metabólito tóxico e mais potente chamado clorpirifós-oxon (CPF-O) (Figura 3). O mecanismo principal de toxicidade destes compostos OFs está relacionado à inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), que proporciona um acúmulo do neurotransmissor acetilcolina (ACh) nos processos sinápticos e na superestimulação de nervos e músculos no sistema nervoso central (SÁNCHEZ-SANTED e colab., 2015; YADAV e colab., 2016).

Figura 3 – Molécula de Clorpirifós (lado esquerdo) e molécula de seu metabólito Clorpirifós-Oxon (lado direito).



Fonte: National Library of Medicine – PubChem (2019)

Por outro lado, algumas evidências indicam que a intoxicação crônica com OFs pode ser caracterizada por efeitos que não são somente atribuídos à inibição da enzima AChE. De fato, algumas evidências experimentais têm apontado para a toxicidade não-colinérgica induzida por compostos OFs como um fator responsável pelo desenvolvimento de síndromes neurotóxicas. No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares relacionados à neurotoxicidade não-colinérgica induzida por OFs (KING e AARON, 2015).

1.6 Docagem Molecular

A abordagem de docagem molecular pode ser utilizada para modelar a interação entre uma molécula pequena (ligante) e uma proteína em nível atômico, o que permite caracterizar o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação de alguma proteína alvo, e também, para explicar seus processos bioquímicos fundamentais. Abordando uma visão metodológica, foram estabelecidas três grandes categorias de docagem, que são: docagem com ligantes e receptores rígidos, docagem com ligantes flexíveis e receptor rígido e docagem com ligantes e receptores flexíveis. (KITCHEN e colab., 2004) O terceiro caso geralmente corresponde ao melhor modelo para se representar o que ocorre em meio biológico pois tanto o ligante quanto a macromolécula são tratados como partes flexíveis, capazes de alterar suas conformações para realizar um encaixe perfeito, e assim, formando o complexo ligante-macromolécula com o menor nível de energia. As grandes desvantagens da docagem flexível se dão pela dificuldade de encontrar a melhor conformação dos

aminoácidos da proteína e o tempo necessário para cada análise quando comparado à docagem com receptor rígido, no qual o espaço de busca conformacional é muito mais limitado (MENG e colab., 2011). Programas de docagem molecular utilizam os denominados algoritmos de amostragem, os quais permitem ao programa testar apenas as conformações mais importantes de um ligante no sítio ativo do alvo molecular ao invés de analisar todas as conformações possíveis, o que seria demoraria muito e exigiria um custo computacional alto (MENG et al., 2011).

Deste modo, utilizou-se neste trabalho uma estratégia baseada em docagem com ligantes flexíveis e receptor rígido já que esta apresenta uma boa relação entre precisão e custo computacional. O processo de docagem envolveu a utilização do programa DOCKTHOR (<https://dockthor.lncc.br/v2/>), tomando como base a estrutura da Proteína Tau Livre (KADAVATH e colab., 2015) e Acoplada ao Microtúbulo (DIMAIO e NOGALES, 2018) (PDBID: 2MZ7 e 6CVN, respectivamente), e estrutura da CPF e CPF-O de acordo com PubChem (PUBCHEM, 2021b, a).

1.6.1 Programa DockThor

O programa DockThor, foi desenvolvido pelo grupo GMMSB/LNCC, utiliza as instalações computacionais fornecidas pela plataforma brasileira de alto desempenho, SINAPAD (www.lncc.br/sinapad), e pelo supercomputador Santos Dumont. O programa implementou um método baseado em grade que emprega um algoritmo genético de estado estável para múltiplas soluções, como o mecanismo de busca e o campo de força MMFF94S (Mecânica Molecular e Campos de Força)(HALGREN, 1996) e a função de pontuação para avaliação de pose. O programa é utilizado através de um servidor web que fornece os principais passos de preparação de ligantes e proteínas, sendo possível alterar os estados de protonação de resíduos e definir o grau de flexibilidade do ligante. É possível também personalizar os principais parâmetros do algoritmo genético (DE MAGALHÃES e colab., 2014; GUEDES e colab., 2017).

Os algoritmos genéticos se baseiam na teoria da evolução de Darwin. Neste sistema, os diferentes graus de liberdade do ligante são codificados como números binários chamados “genes”. Estes genes são agrupados para formar um “cromossomo” que representa uma pose de um dado ligante no sítio ativo da proteína. Mutações e crossover entre cromossomos ocorrem com o intuito de gerar novos

genes (variação genética) e uma função de escore avalia e seleciona quais seriam os cromossomos mais aptos a sobrevivência enquanto os demais seriam removidos. Em outras palavras, esta função de escore determina quais as conformações do ligante seriam mais prováveis dentro do sítio ativo da proteína. (MENG e colab., 2011; RAMÍREZ e CABALLERO, 2018).

1.6.2 Cálculo de energia total do DockThor

O programa DockThor utiliza um arquivo de topologia para o ligante e cofatores e um arquivo de entrada específico para a proteína contendo os tipos de átomos e cargas parciais do campo de força MMFF94S (HALGREN, 1996), e ambos são gerados usando ferramentas internas dos programas como o MMFFLigand e o PdbThorBox. O arquivo do ligante é gerado pelo programa MMFFLigand, que utiliza as ferramentas químicas Open Babel (O'BOYLE e colab., 2011) para: (i) derivar cargas parciais e tipos de átomos com o campo de força MMFF94S, (ii) definir as ligações rotativas e os grupos hidroxila terminais; e (iii) calcular as propriedades necessárias para calcular as interações intramoleculares.

Para os cálculos referente ao receptor (no caso a proteína Tau-L), o programa PdbThorBox é usado para definir os tipos de átomos de proteína e as cargas parciais do campo de força MMFF94S. Assim, no programa DockThor, tanto a proteína quanto o ligante (incluindo moléculas de cofator) são tratados com o mesmo campo de força no experimento de docagem. O espaço de busca é representado como uma caixa de grade onde os potenciais são armazenados nos pontos da grade, reduzindo significativamente o custo computacional (SANTOS e colab., 2020).

Em cada corrida de docagem, o programa DockThor usa diferentes entradas aleatórias para que os indivíduos da população sejam gerados, e assim, definindo valores aleatórios para todos os graus de liberdade rotacional, translacional e conformacional do ligante. O programa utiliza um algoritmo genético de estado estacionário de solução múltipla baseado em aglomeração fenotípica como método de pesquisa (DE MAGALHÃES e colab., 2014). Nesta estratégia, o método de substituição parental segue a Seleção Dinâmica de Torneio Restrito, que fornece uma melhor exploração da hipersuperfície de energia e permite a identificação de múltiplas soluções de mínimos em uma única corrida, preservando a diversidade populacional das estruturas geradas. Os parâmetros deste algoritmo foram definidos da seguinte

forma: (i) 24 corridas de acoplamento por discretização de grade, (ii) 1 milhão de avaliações por corrida de acoplamento, (iii) população de 750 indivíduos.

A função de pontuação usada para pontuar as poses encaixadas é baseada na soma dos seguintes termos do campo de força MMFF94S e é chamada de "Energia Total": (i) energia de interação intermolecular calculada (a soma de van der Waals e potenciais eletrostáticos entre os pares de átomos de proteína- ligante); (ii) energia de interação intramolecular calculada como a soma de van der Waals e potenciais eletrostáticos entre os pares de 1-4 átomos, e (iii) termo de torção de o ligante(SANTOS e colab., 2020).

1.6.3 Cálculo de RMSD do DockThor

O Desvio Quadrado Médio da Raiz (RMSD) é a medida quantitativa mais comumente usada de cálculo de semelhança entre duas coordenadas atômicas sobrepostas. Os valores RMSD são apresentados em Å e calculado pela equação:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n d_i^2}$$

Onde a média é calculada sobre os n pares de átomos equivalentes e d_i é a distância entre os dois átomos no i -ésimo par, que traduzido ao DockThor se abre na equação:

$$RMSD = \sqrt{\frac{\sum_N^i [(x_i - x_{ref})^2 + (y_i - y_{ref})^2 + (z_i - z_{ref})^2]}{N}}$$

Onde a soma se refere a todos os peptídeos da backbone e os átomos pesados. E i e ref indica os átomos da pose de docagem e a estrutura nativa usada como referência no modo de docagem. N é o número total de pares dos átomos considerados, e x , y e z são coordenadas atômicas.

O RMSD pode ser calculado para qualquer tipo e subconjunto de átomos; por exemplo: (i) os átomos carbono-alfa de toda a proteína, (ii) os átomos carbono-alfa de

todos os resíduos de aminoácidos; (iii) todos os átomos pesados de resíduos de aminoácidos, ou (iv) todos os átomos pesados de um ligantes pequeno. Um átomo pesado se refere ao Oxigênio e o Cloro nesse estudo de acordo com a tabela de átomos pesados (PIKE e colab., 2016) .

A medida RMSD é aplicada pela ferramenta interna do DockThor chamado DTStatistic.

2 DESENVOLVIMENTO E METODOLOGIA

Dentro do universo do Design de Drogas Assistida por Computação (termo do inglês “Computer-Aided Drug Design”) existe uma modalidade conhecida como Docagem por Acoplamento Cego (DAC) (termo do inglês “Blind Docking”).

Objetivo geral: Utilizar o método *in silico* de docagem molecular para buscar uma interação entre defensores agrícolas, da classe dos organofosforados, com a proteína Tau livre na formação da proteína Tau Hiperfosforilada (uma das rotas causadoras da DA). Objetivos específicos: (i) Utilizar a técnica de DAC para localizar possíveis sítios de reação da proteína tau livre; (ii) fazer a docagem do CPF e CPF-O com o programa DockThor; (iii) avaliar as interações com as poses que obtiveram os melhores indicadores de docagem (energia total e RMSD).

2.1 Docagem por Acoplamento Cego

Quando o sítio de acoplamento em uma proteína para ligantes não é conhecido ou especificado, prever o posicionamento de acoplamento fica extremamente desafiador, já que para esses casos, utilizando o DAC, o programa tem que fazer uma varredura em toda proteína para buscar possíveis sítios de acoplamento (HETÉNYI e SPOEL, 2006).

Existem dois métodos principais de realizar um DAC. Um dos métodos consiste em desenhar uma caixa (do termo em inglês “Grid”) na região da proteína onde se tem interesse de buscar possibilidades de acoplamentos. Assim, o programa realiza uma varredura com o ligante em toda a superfície do receptor, e é capaz de registrar as regiões prováveis de ocorrer uma reação. No segundo método, conhecido como Acoplamento Cego com Detecção Guiada de Cavidade, o programa realiza uma varredura na superfície do receptor antes de testar quaisquer ligantes e então, só após encontrar possíveis regiões de acoplamento, que o programa os testará com ligantes. O Dockthor já foi utilizado para realizar algumas DAC e obteve-se resultados satisfatórios em situação na qual a caixa encobria toda a superfície do receptor (HETÉNYI e SPOEL, 2006).

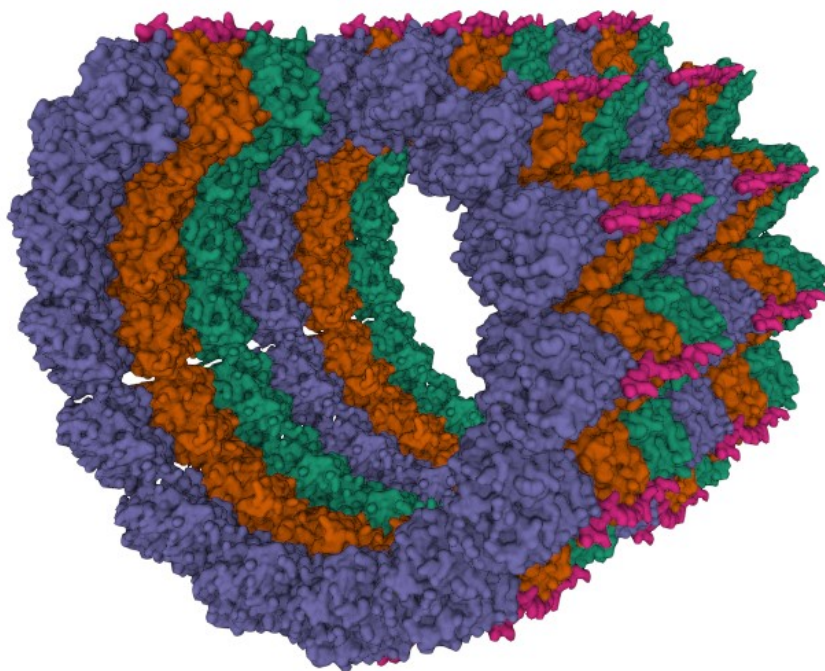
Um dos maiores desafios do DAC é a acurácia, devido ao maior número de acoplamentos possíveis que devem ser considerados no momento do cálculo. Porém,

na circunstância de se trabalhar somente com um ligante específico e não um grupo de ligantes diferentes (normalmente aplicado quando se utiliza uma triagem virtual, do inglês “virtual screening”) favorecendo a um menor custo computacional. Assim, amplia-se as chances de encontrar mais de uma cavidade, no qual será necessário realizar docagens exclusivas nas regiões posteriormente.

2.1.1 Receptores

Quando se pesquisa pela estrutura da proteína Tau na literatura, observa-se que é uma molécula amplamente estudada, existindo uma ampla disposição de estruturas para se utilizar quando se pensa em docagem. Dentre os resultados no RCSB-PDB, optou-se por trabalhar com duas estruturas. A 6CVN que é a proteína tau (Tau-AM) acoplada ao microtúbulo (Figura 4 e 5) e a 2MZ7 que é a versão da proteína tau livre (Tau-L) (Figura 6). Essas duas foram selecionadas por serem estudos na tau de humanos, sem mutação detectada e resoluções abaixo de 4 Å.

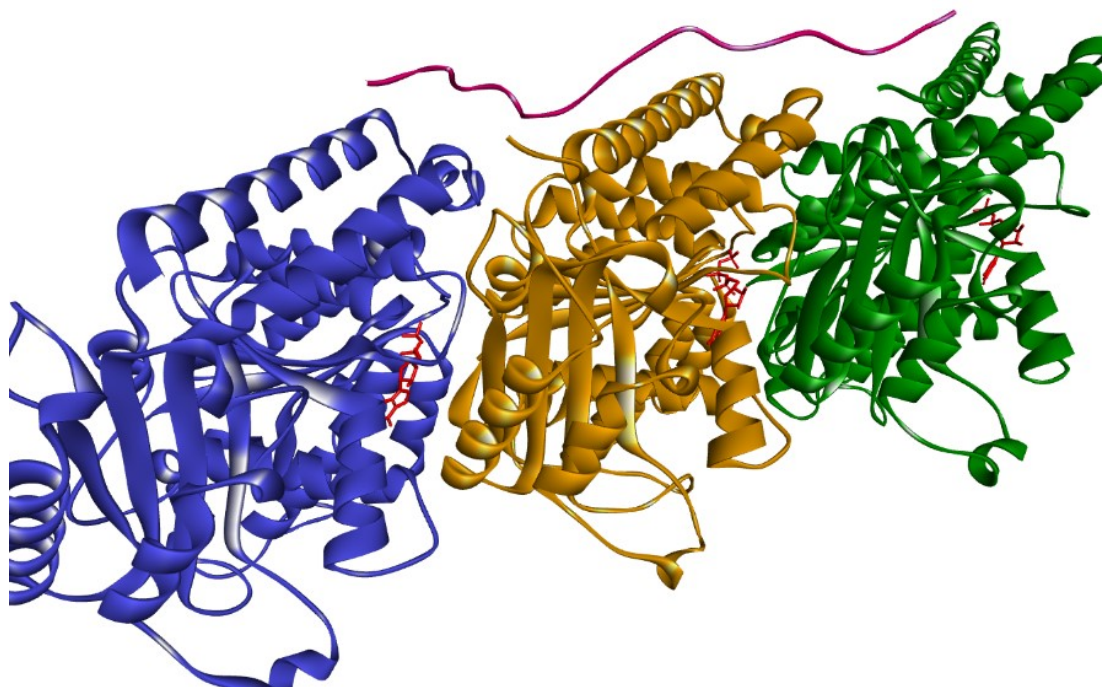
Figura 4 – Visualização gráfica da proteína 6CVN. As tubulinas do microtúbulo (em roxo, laranja e verde) com a proteína tau acoplada na região exterior (em rosa).



Fonte: RCSB – Protein Data Bank (2018).

Após a seleção dos receptores, um desafio encontrado foi que a Tau-AM apresentava sítios reacionais referência, porém todos os sítios estavam localizados na tubulina- α e tubulina- β , e não na proteína tau.

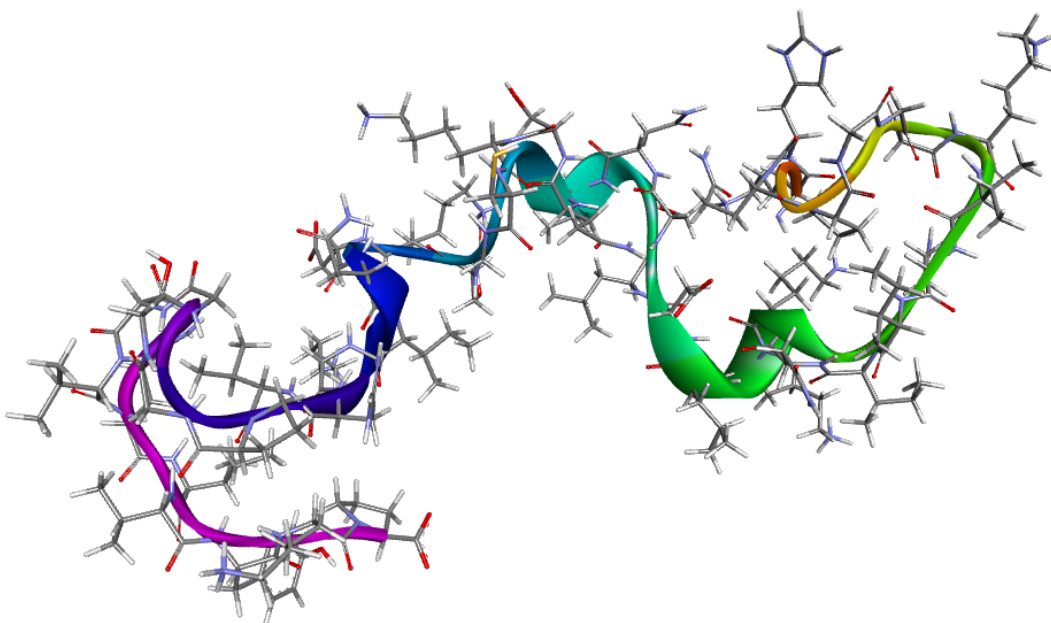
Figura 5 – Ampliação de uma região da 6CVN, apresentando o ligante em vermelho localizado nas estruturas da tubulina (tubulina em roxo, laranja e verde) e a proteína tau (filamento em rosa acima da tubulina).



Fonte: RCSB – Protein Data Bank (2018).

Já a Tau-L, não apresentou um ligante de referência nos seus estudos, logo não apresentou um sítio reacional de referência para poder se iniciar os cálculos de docagem.

Figura 6 – Proteína Tau Livre (2MZ7).

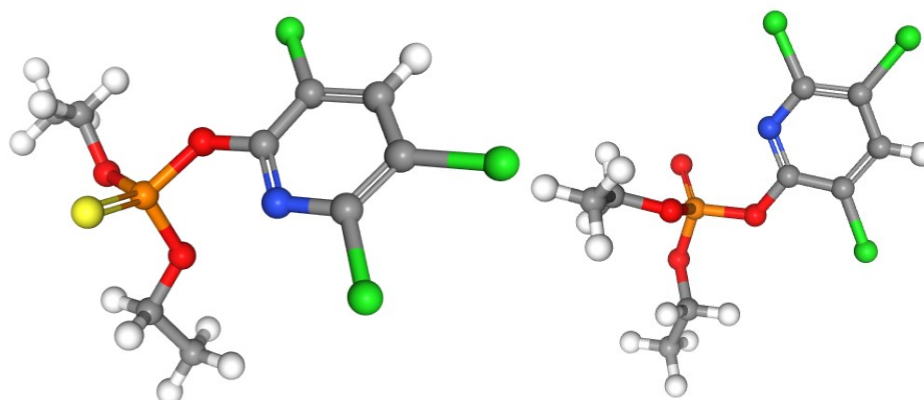


Fonte: RCSB – Protein Data Bank (2015).

2.1.2 Preparo dos Ligante

Para obtermos as estruturas do CPF e do CPF-O com energia minimizada utilizou-se o programa MolView v2.4 © 2015 (Figura 7). Utilizou-se o algoritmo oferecido pelo programa para gerar a estrutura de mínima energia através do MMFF94, realizando somente um máximo de 100 minimizações por etapa. Então, salvou-se na extensão de arquivo mol2 que é compatível e utilizado para o DOCKTHOR.

Figura 7 – Molécula de CPF (esquerda) e CPF-O (direita) após a otimização conformacional energética.



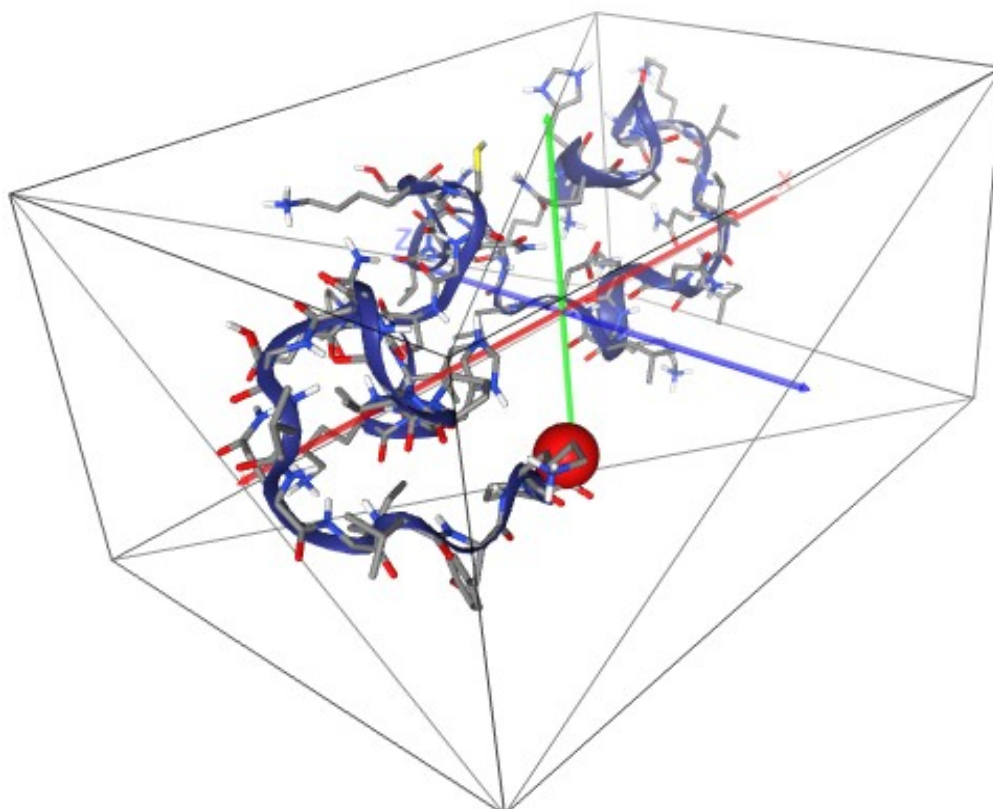
Fonte: MolView v2.4 (2021).

2.2 Docagem Proteína Tau-Livre com CPF e CPF-O

O preparo inicial da Tau-L no DockThor seguiu os mesmos passos para ambas corridas com as moléculas de ligante de CPF e CPF-O, buscando ter um cuidado para utilizar os mesmos parâmetros de caixa para avaliação da superfície do receptor. Os parâmetros foram: a utilização do algoritmo genético com 1 milhão de avaliações; população de 750; e 24 corridas por segmento da caixa. Numa caixa de configuração 40x40x28 (Figura 8) com uma discretização de 0,42.

Em seguida, adicionou-se os ligantes CFP e CPF-O. Para cada ligante foi realizada uma rodada, as quais duraram 7h31min e 5h27min, respectivamente.

Figura 8 – Preparação da Tau-L no DOCKTHOR. A caixa envolta da molécula indica a região no qual o programa irá procurar por sítios de acoplamento.



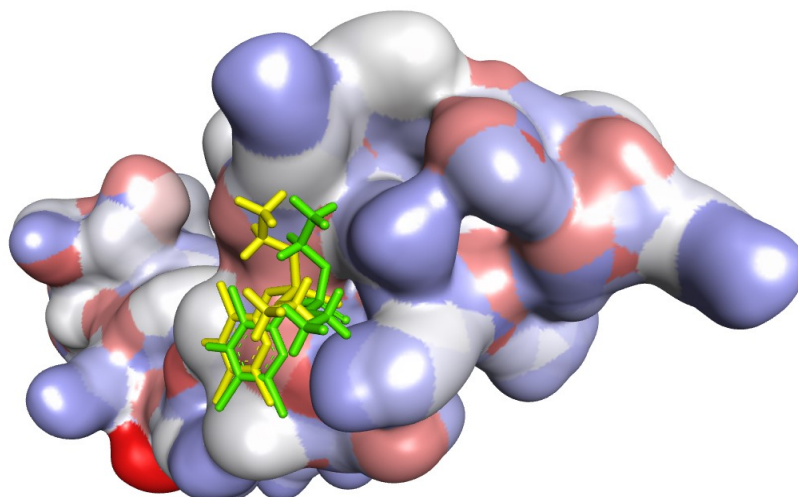
Fonte: DockThor (2021).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ambos os ligantes apresentaram sítios de acoplamentos na mesma região, e o ligante CPF apresentou um sítio adicional em outra região da Tau-L. As imagens dos acoplamentos apresentados a seguir, a Tau-L estará apresentada com uma superfície de potência eletroestático, no qual as cores vermelhas e azuis representam cargas negativas e positivas, respectivamente (HAJI-GHASSEMI e colab., 2015). Para o sítio onde ambos os ligantes acoplaram, denominou-se de Sítio-A (Figura 9). Para o sítio onde somente o CPF acoplou, denominou-se de Sítio-B (Figura 10).

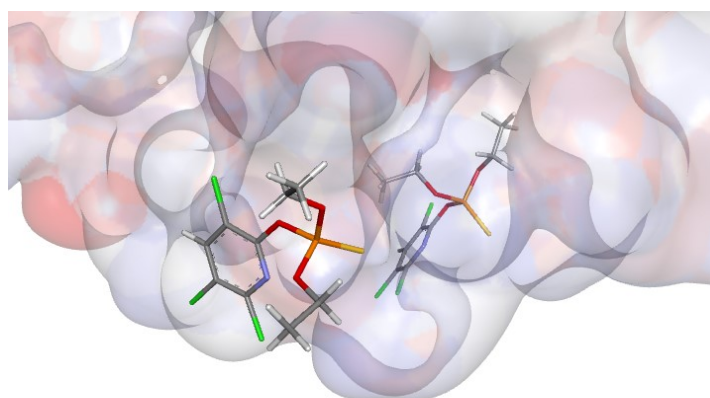
Todas as imagens abaixo foram geradas pelo programa BIOVIA Discovery Studio © 2021.

Figura 9 – Sítio A de acoplamento. Em verde a molécula de CPF e em amarelo a molécula CPF-O.



Fonte: O autor (2021).

Figura 10 – Visualização da molécula de CPF no Sítio B simultaneamente com Sítio A atrás.



Fonte: O autor (2021).

O critério para a formação do ranque de poses dos acoplamentos foi baseado nos valores de RMSD e depois comparando as energias total mínima de interação (KITCHEN e colab., 2004). Considerando-se como: (a) resultado bom quando $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$; (b) resultado aceitável quando o RMSD está entre $2,0 \text{ \AA}$ e $3,0 \text{ \AA}$; e (c) resultado ruim quando o $\text{RMSD} \geq 3,0 \text{ \AA}$ (RAMÍREZ e CABALLERO, 2018).

Para ambos os ligantes selecionados para o estudo apresentando mais de 20 poses favoráveis. Foram considerados somente os resultados considerados bons, com um RMSD abaixo de $2,0 \text{ \AA}$. Depois, utilizou-se a Energia Total para ranquear as poses referente a mesma molécula depois que aceito no primeiro critério.

3.1 Cálculo da Tau-Livre com CPF-O

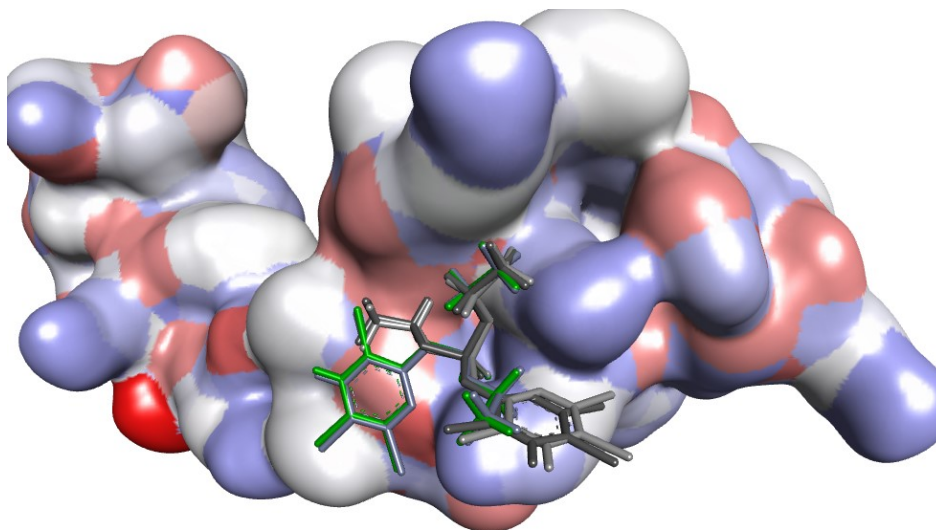
Os resultados com a menor energia foram a pose do ligante 9 (Figura 12), e abaixo o rank com as 10 melhores poses para o CPF-O e também uma representação das quatro melhores poses simultaneamente no sítio (Figura 11).

Tabela 1 – Ranque em ordem de energia total de interação da molécula de CPF-O com o Sítio A da proteína Tau-L.

Ranque das Poses do Ligante		
Posição	Pose	Energia Total / kcal·mol ⁻¹
1	9	-20,271
2	18	-18,909
3	17	-17,953
4	23	-17,685
5	8	-17,504
6	11	-16,728
7	21	-16,438
8	19	-16,282
9	3	-16,123
10	1	-15,890

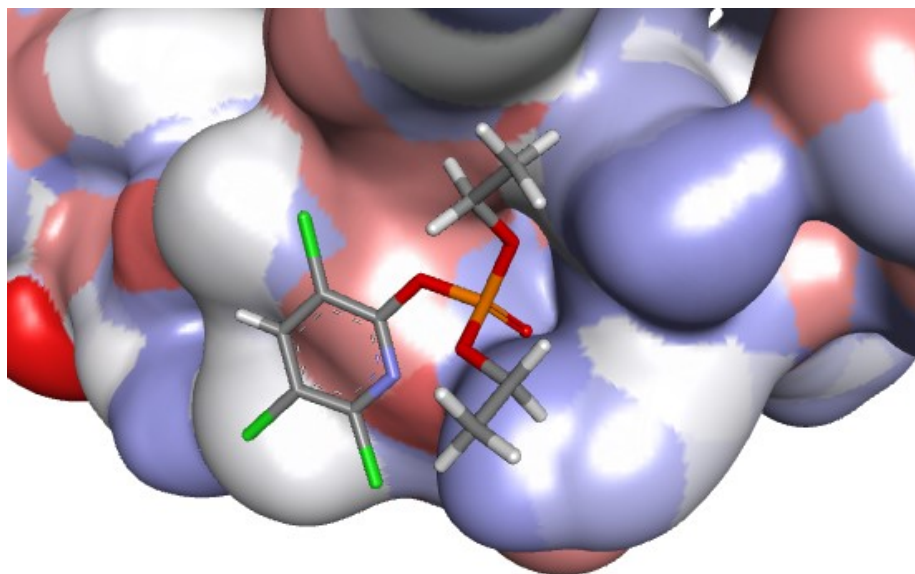
Fonte: O autor (2021).

Figura 11 – As melhores quatro poses do ranque visualizadas simultaneamente no Sítio A, sendo a verde a pose 9 que ocupa a primeira posição.



Fonte: O autor (2021).

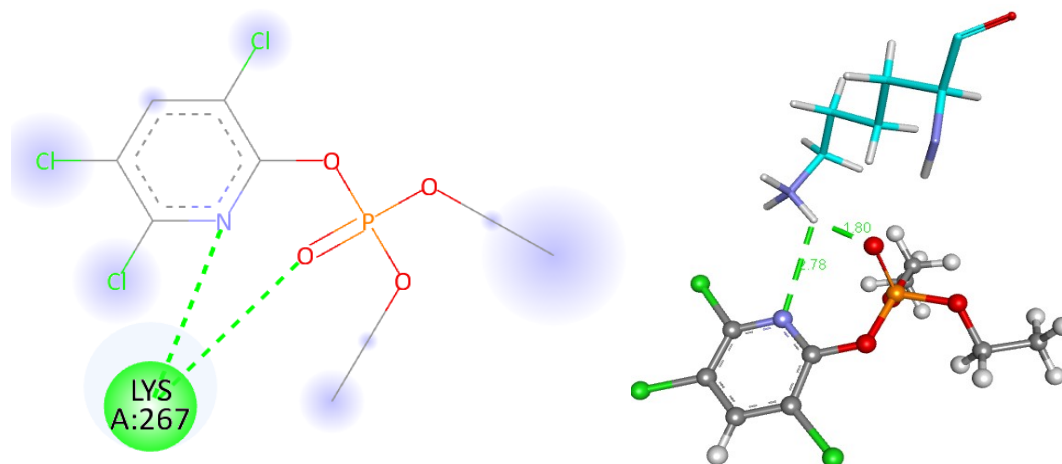
Figura 12 – A melhor pose (Pose 9) acoplada no Sítio A.



Fonte: O autor (2021).

Considerando as interações de Hidrogênio, obtemos que o resíduo de Lisina 267 é a interação principal para esse sítio de acoplamento (Figura 13). A distância atômica das ligações foram $D_1=1,80 \text{ \AA}$ e $D_2=2,78 \text{ \AA}$.

Figura 13 – Visualização 2D (esquerda) e 3D (direita) das interações de hidrogênio entre a molécula CPF-O e a Lisina 267.



Fonte: O autor (2021).

3.2 Cálculo da Tau-Livre com CPF

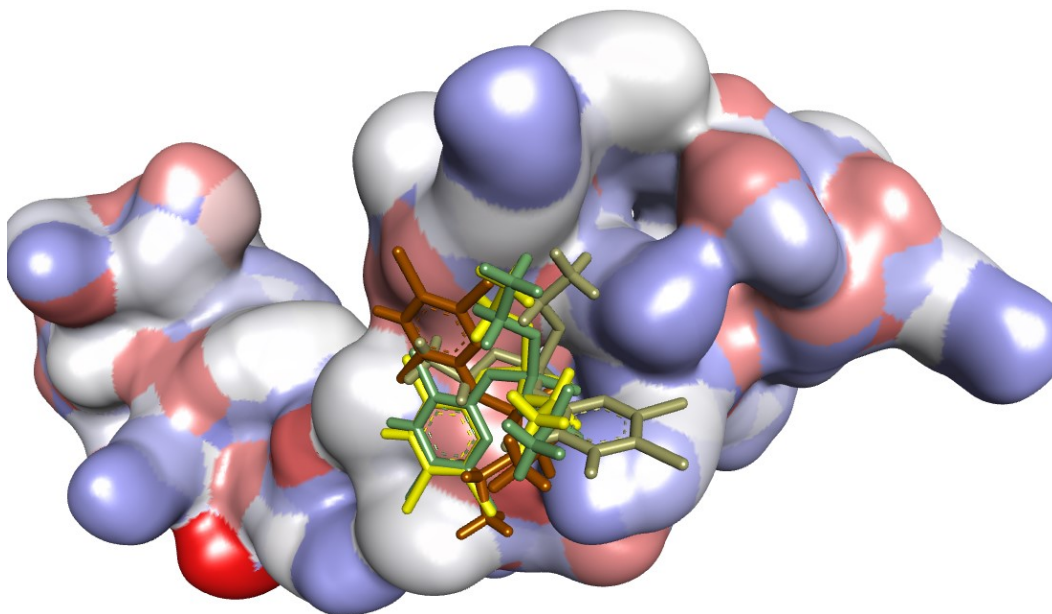
Os resultados com a menor energia foram a pose do ligante 11 (Figura 15) para o mesmo sítio de acoplamento que o CPF-O (Sítio A). E para o segundo sítio (Sítio B), a posição 16 foi a primeira de energia mais baixa ocupando a terceira posição no ranque geral de energia.

Tabela 2 - Ranque em ordem de energia total de interação da molécula de CPF com o Sítio A e B da proteína Tau-L.

Ranque das Poses do Ligante			
Posição	Pose	Energia Total / kcal·mol ⁻¹	Sítio Localizado
1	11	-17,472	A
2	14	-16,992	A
3	16	-16,896	B
4	3	-16,850	B
5	21	-16,494	A
6	5	-16,144	A
7	5	-15,802	B
8	8	-15,743	B
9	15	-15,656	A

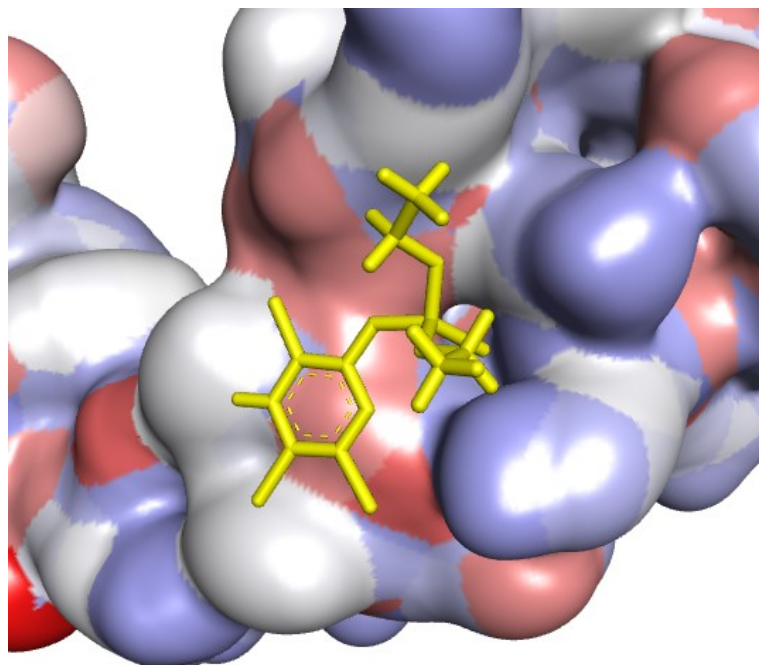
Fonte: O autor (2021).

Figura 14 – As melhores quatro poses do ranque visualizadas simultaneamente no Sítio A, sendo a amarelo a pose 11 que ocupa a primeira posição (poses 11, 14, 21, 5).



Fonte: O autor (2021).

Figura 15 – A melhor pose (Pose 11) acoplada no Sítio A.

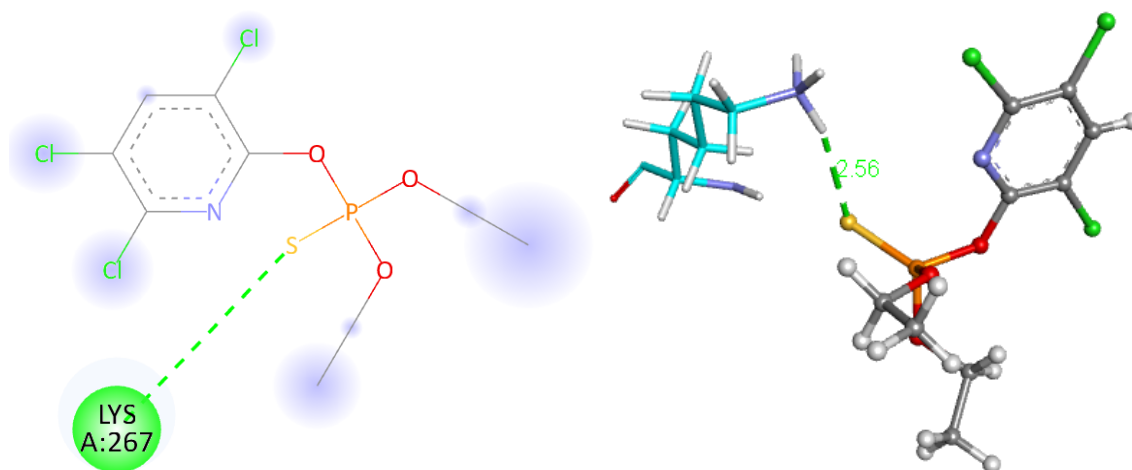


Fonte: O autor (2021).

Considerando as interações de Hidrogênio para o Sítio A, obtemos que o resíduo de Lisina 267 é a interação principal para esse sítio de acoplamento.

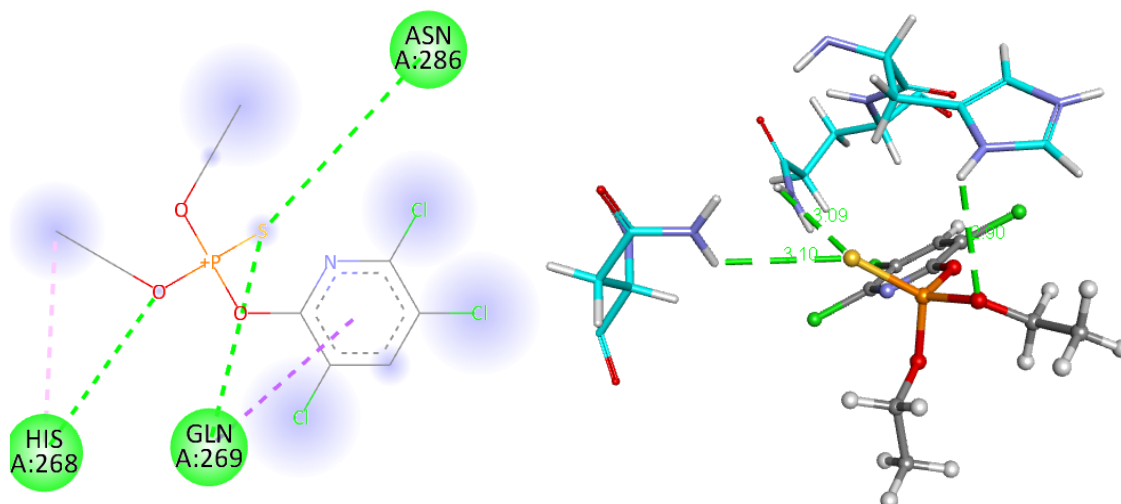
Coincidindo com o mesmo acoplamento do CPF-O (Figura 16). Ambos os cálculos para o CPF e o CPF-O foram rodados separadamente. Porém, dessa vez, apresentou-se somente uma interação de hidrogênio com a distância atômica das ligações foram 2,56 Å.

Figura 16 – Sítio A. Visualização 2D (esquerda) e 3D (direita) das interações de hidrogênio (distância de 2,56 Å) entre a molécula CPF e o resíduo de Lisina 267.



Fonte: O autor (2021).

Figura 17 – Sítio B. Visualização 2D (esquerda) e 3D (direita) das interações de hidrogênio (distância da ASN de 3,10 Å; da GLN de 3,09 Å; e da HIS de 2,90 Å) entre a molécula CPF e os resíduos de Asparagina, Glutamina e Histidina.



Fonte: O autor (2021).

Para o Sítio B houve três interações de hidrogênio, com os resíduos de Asparagina 286, Glutamina 269 e Histidina 268, com as distâncias de ligação de $D_{s2.1}=3,10 \text{ \AA}$, $D_{s2.2}=3,09 \text{ \AA}$ e $D_{s2.3}=2,90 \text{ \AA}$, respectivamente (Figura 17).

As diferenças em tamanho de ligação do CPF e CPF-O deve-se principalmente ao fato do átomo de oxigênio ser menor e mais eletronegativo que o fósforo. Ambos os átomos são da mesma família na tabela periódica, e assim, possuem características de interação com o hidrogênio similar, podendo se diferenciar pela intensidade neste caso (HUHEEY, 1965). Pode-se atribuir a diferença de energia do melhor resultado de ambas as docagens o fato do CFP-O estar mais próximo do sítio ativo e conseqüentemente podendo gerar outras interações visíveis além da ligação de hidrogênio.

4 CONCLUSÃO

Utilizando a técnica de docagem molecular entre a proteína Tau e as duas variações clorpirifós (CPF e CPF-O), encontrou-se dois sítios de reação para o CPF, e somente um sítio para o CPF-O que compartilhava das mesmas interações do CPF (Sitio A).

O cálculo utilizando o programa DOCKTHOR e a estratégia de docagem as cegas realizando uma varredura total na superfície da proteína Tau-Livre gerou resultados de energia e distância satisfatórios e coerentes com alguns encontrados sobre o mesmo assunto no artigo de validação do DockThor. Pode-se atribuir a diferença de tempo de 2h04min entre os cálculos do dois ligantes o fato de o CPF ter encontrado mais um sítio de interação. As energias totais da melhor pose atribuída pelo DOCKTHOR para o Sitio A sendo -17,472 kcal/mol para o CPF e -20,271 kcal/mol; e para o Sitio B uma energia total de -16,896 kcal/mol.

Esses resultados são apenas um início de um projeto de pesquisa que tem um potencial de gerar outras novas pesquisas. Um próximo passo importante seria a validação desses sítios de acoplamentos em outros softwares com outros parâmetros e algoritmos.

O propósito para esse projeto foi alcançado com resultados “positivos”, o que também causa uma preocupação e exige uma atenção para os riscos de defensivos agrícolas e doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. **Biologia Molecular da Célula**. 6a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- BURNS, Alistair e ILIFFE, Steve. **Alzheimer's disease**. *BMJ (Online)*, v. 338, n. 7692, p. 467–471, 2009.
- DE MAGALHÃES, C. S. e colab. **A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands**. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 289, p. 206–224, 2014.
- DENT, Erik D. e BAAS, Peter W. **Microtubules in neurons as information carriers**. *Journal of Neurochemistry*, v. 7, n. 8, p. 656–664, 2011.
- DIMAIO, Frank e NOGALES, Eva. **Near-atomic model of microtubule-tau interactions**. v. 1246, n. June, p. 1242–1246, 2018.
- FARRER, Lindsay A. e colab. **Effects of Age , Sex , and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease**. v. 02118, 2015.
- GOEDERT, Michel e EISENBERG, David S e CROWTHER, R Anthony. **Propagation of Tau Aggregates and Neurodegeneration**. p. 189–212, 2017.
- GUEDES, Isabella A e KREMPSER, Eduardo e DARDENNE, Laurent E. **DockThor 2 . 0 : a Free Web Server for Protein-Ligand Virtual Screening**. v. 2013, p. 2013–2014, 2017.
- HAJI-GHASSEMI, Omid e colab. **Antibody recognition of carbohydrate epitopes**. *Glycobiology*, v. 25, n. 9, p. 920–252, 2015.
- HALGREN, Thomas A. **Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94**. *Journal of computational chemistry*, v. 17, p. 490–519, 1996.

HETÉNYI, Csaba e SPOEL, David Van der. **Blind docking of drug-sized compounds to proteins with up to a thousand residues**. FEBS Letters, v. 580, n. 5, p. 1447–1450, 2006.

HIMMLER, Adolf e colab. **Tau Consists of a Set of Proteins with Repeated C-Terminal Microtubule-Binding Domains and Variable N-Terminal Domains**. v. 9, n. 4, p. 1381–1388, 1989.

HUHEEY, James E. **The Electronegativity of Groups**. Journal of Physical Chemistry®, v. 69, n. 10, p. 3284–3291, 1965.

IHARA, Yasuo e MORISHIMA-KAWASHIMA, Maho e NIXON, Ralph. **The Ubiquitin – Proteasome System and the Autophagic – Lysosomal System in Alzheimer**. p. 1–28, 2015.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13a. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2017.

KADAVATH, Harindranath e colab. **Angewandte Folding of the Tau Protein on Microtubules ** Angewandte**. p. 10347–10351, 2015.

KAMETANI, Fuyuki e HASEGAWA, Masato. **Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease**. Frontiers in Neuroscience, v. 12, n. JAN, 2018.

KILLIN, Lewis O J e colab. **Environmental risk factors for dementia : a systematic review**. BMC Geriatrics, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12877-016-0342-y>>.

KING, Andrew M. e AARON, Cynthia K. **Organophosphate and Carbamate Poisoning**. Emergency Medicine Clinics of North America, v. 33, n. 1, p. 133–151, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.emc.2014.09.010>>.

KITCHEN, DB e colab. **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications**. Nat Rev Drug Discov., 2004.

KUTTER, Steffen e colab. **Regulation of Microtubule Assembly by Tau and not by Pin1**. *Journal of Molecular Biology*, v. 428, n. 9, p. 1742–1759, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.010>>.

LASSER, Micaela e TIBER, Jessica e LOWERY, Laura Anne. **The Role of the Microtubule Cytoskeleton in Neurodevelopmental Disorders**. v. 12, n. June, p. 1–18, 2018.

LEE, V.M. e GOEDERT, M. e TROJANOWSKI, J. **Neurodegenerative Tauopathies**. *Annual Review of Neuroscience*, v. 241(1), p. 1121–1159, 2001.

MENG, Xuan-Yu e colab. **Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery**. *Current Computer-Aided Drug Design*, v. 7, n. 2, 2011.

MOSTAFALOU, Sara e ABDOLLAHI, Mohammad. **The link of organophosphorus pesticides with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases based on evidence and mechanisms**. *Toxicology*, v. 409, n. March, p. 44–52, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.07.014>>.

O'BOYLE, N.M. e BANCK, M. e JAMES, C.A. et al. **Open Babel: An open chemical toolbox**. *Journal of Cheminformatics*, 2011.

PIKE, Ashley C.W. e colab. **An overview of heavy-atom derivatization of protein crystals**. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, v. 72, n. 3, p. 303–318, 2016.

PING, Fong e colab. **Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer ' s Disease**. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 38, n. 5, p. 965–980, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10571-017-0574-1>>.

PUBCHEM, National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 21804, Chlorpyrifos oxon**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos-oxon>>. Acesso em: 21 nov 2021a.

PUBCHEM, National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 2730, Chlorpyrifos**.

RAMÍREZ, David e CABALLERO, Julio. **Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data ?** *Molecules*, v. 23, n. 5, p. 1–17, 2018.

RIEDEL, Gernot e colab. **Mechanisms of Anticholinesterase Interference with Tau Aggregation Inhibitor Activity in a Tau-Transgenic Mouse Model.** *Current Alzheimer Research*, v. 17, n. 3, p. 285–296, 2020.

ROBBINS e COTRAN. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças.** 9a. ed. [S.l.]: Elsevier, 2010.

SÁNCHEZ-SANTED, Fernando e COLOMINA, Maria Teresa e HERNÁNDEZ, Elena Herrero. **Organophosphate Pesticide exposure and neurodegeneration.** *Cortex*, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>>.

SANTOS, Karina B. e colab. **Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-Peptide Data Set.** *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 60, n. 2, p. 667–683, 2020.

TANG, Bor Luen. **Neuropathological Mechanisms Associated with Pesticides in Alzheimer ' s Disease.** v. 42, p. 1–16, 2020.

VOORHEES, Jaymie R e colab. **Occupational-like organophosphate exposure disrupts microglia and accelerates de fi cits in a rat model of Alzheimer ' s disease.** *npj Aging and Mechanisms of Disease*, n. December 2018, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41514-018-0033-3>>.

WANG, Jian Zhi e LIU, Fei. **Microtubule-associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons.** *Progress in Neurobiology*, v. 85, n. 2, p. 148–175, 2008.

WARD, Alex e colab. **Mild cognitive impairment: Disparity of incidence and prevalence estimates.** *Alzheimer's & Dementia*, v. 8, n. 1, p. 14–21, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2011.01.002>>.

WISCHIK, Claude M. e HARRINGTON, Charles R. e STOREY, John M.D. **Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease.** *Biochemical Pharmacology*, v. 88, n. 4, p. 529–539, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.008>>.

YADAV, Sunishtha e SINGH, Manish Kumar e YADAV, Rajesh Singh. **Organophosphates Induced Alzheimer ' s Disease : An Epigenetic Aspect** iMedPub Journals **Organophosphates Induced Alzheimer ' s Disease : An Epigenetic Aspect Abstract**. n. January, 2016.

YEGAMBARAM, Manivannan e colab. **Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer ' s Disease : A Review**. p. 116–146, 2015.